

Pemetaan Enzim Restriksi Gen KiSS1 pada Kambing

Latifah^a, Hanum Muarifah^b, Achmad Guntur^a dan Atik^a

^aProdi Peternakan, Universitas Pendidikan Muhammadiyah Sorong

^bFakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

^aJl. Kh. Ahmad Dahlan No.01, Mariyat Pantai, Aimas, Kabupaten Sorong, Papua Barat

^bJalan Veteran, Ketawanggede, Lowokwaru, Ketawanggede, Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 65145

*Corresponding author: latifah@unimudasorong.ac.id

ABSTRAK

Enzim restriksi memiliki peran penting dalam menentukan keragaman dan fungsi *in vivo*. Penelitian ini bertujuan untuk memetakan enzim restriksi pada gen KiSS1 kambing. Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah data sekuen gen KiSS1 kambing yang tersedia pada NCBI. Desain primer dilakukan menggunakan program Primer3. Primer digunakan untuk mengapit target gen KiSS1 yang dipetakan enzim restriksinya. Pada penelitian ini ditemukan 3 enzim yaitu *BsrB1* (SNP g.505A/T), *FatI* dan *NlaIII* (SNP g.1608G/A). Ketiga enzim tersebut dapat direkomendasikan untuk penelitian selanjutnya yaitu *genotyping* menggunakan metode PCR-RFLP.

Kata kunci: Kambing, KiSS1, Primer3, Pemetaan enzim restriksi, BioEdit.

ABSTRACT

The restriction enzyme plays a vital role in determining diversity and in vivo function. This research aimed to map the restriction enzyme in the KiSS1 gene of the goat. Data sequences from NCBI were used for this study. Primer design was constructed using the Primer3 program. The primer is used for flanking the KiSS1 gene target. Three restriction enzymes were detected in this study (BsrB1 for SNP g.505A/T, FatI, and NlaIII for SNP g.1608G/A). The three restrictions enzyme found in this study can be a recommendation for genotyping using the PCR-RFLP method.

Keywords: Goat, KiSS1, Primer3, Restriction enzyme mapping, BioEdit.

PENDAHULUAN

Enzim restriksi merupakan komponen penting untuk menentukan keragaman dan fungsi *in vivo* dalam biologi molekuler (Williams, 2003). Enzim restriksi dapat dipetakan menggunakan program analisis sekuen DNA salah satunya adalah BioEdit. BioEdit merupakan program yang dapat digunakan dalam penjabaran sekuen DNA, analisis perubahan asam amino, pemetaan enzim restriksi dan berbagai analisis genetik lainnya. BioEdit digunakan untuk analisis dasar dalam analisis sekuen DNA (Hall et al., 2011).

Pada penelitian ini dilakukan pemetaan enzim restriksi sekuen DNA gen KiSS1 pada kambing. Data sekuen berdasarkan data *GenBank* yang tersedia di NCBI. Pemetaan enzim restriksi telah dilakukan pada sekuen DNA gen MC4R kambing Bligon pada penelitian sebelumnya (Latifah et al., 2017). Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi dasar untuk penelitian selanjutnya yaitu penggunaan enzim restriksi untuk *genotyping* dengan metode PCR-RFLP.

MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah enam data sekuen gen KiSS1 kambing yang diambil dari *database GenBank* NCBI. *GenBank* yang digunakan antara lain *GenBank Acc. No.* JX047312.1; GU142847.1; KC989928.1; JQ796693.1; KR065750.1; NC_030823.1. Desain primer menggunakan Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). Desain primer menggunakan *template* sekuen DNA gen KiSS1 *Acc. No.* GU142847.1. Primer dan target gen KiSS1 yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 1. Pemetaan enzim restriksi target gen KiSS1 dilakukan dengan menggunakan program BioEdit ver. 7.2.0.

Tabel 1. Hasil desain primer menggunakan Primer3

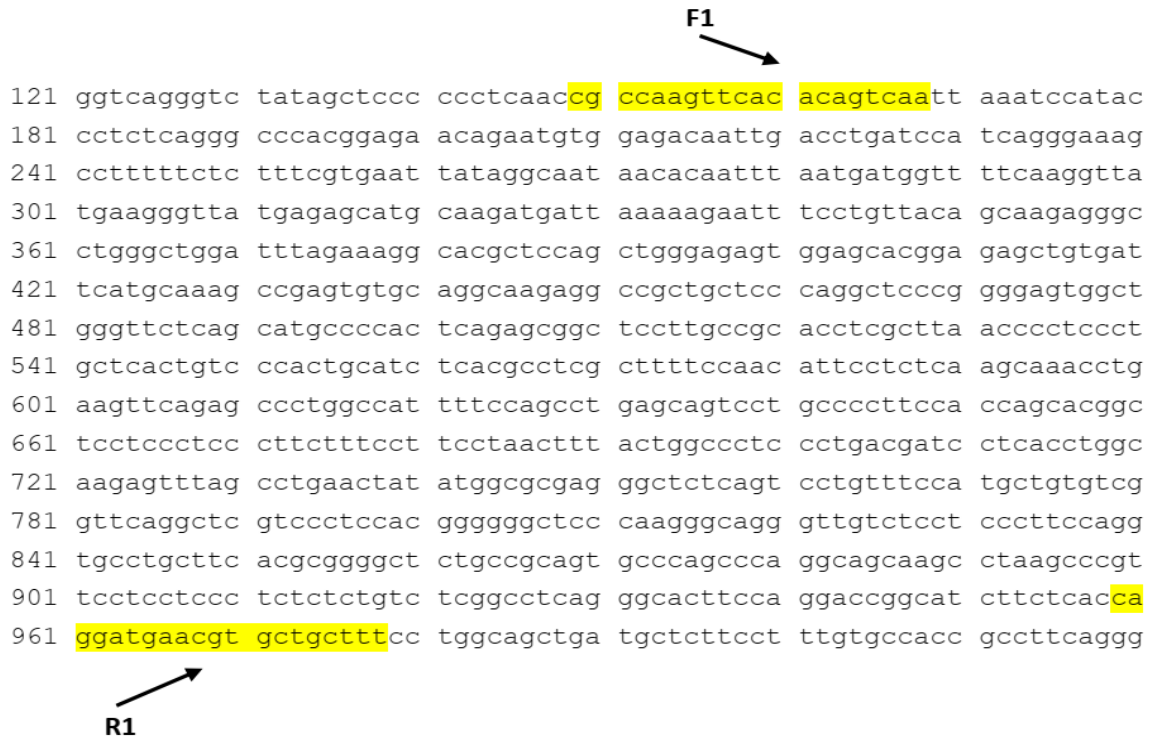
Nama primer	Sekuen	Lokasi target	Panjang gen (bp)	<i>Melting time</i> primer (°C)
KiSS1.L1	F1: CGCCAAGTTCACACAGTCAA R1: AAAGCAGCACGTTTCATCCTG	5'UTR-ekson 1 (145-978)	830	59.12
KiSS1.L2	F2: GGTTGTCTCCTCCCTTCCAG R2: GCGGTTCTTGGGCTCTAAAG	5'UTR-Ekson 1- intron 1 (820-1901)	948	58.91
KiSS1.L3	F3: TGTTGAAGGAGAGAGGAGCA R3: TTGCTTCGGGACACAAACTG	Intron 1-Ekson 2 (3091-3665)	579	58.98

Catatan: Referensi sekuen *GenBank Acc. No.* GU142847.1

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen KiSS1 merupakan gen potensial yang berpengaruh pada sifat-sifat reproduksi pada kambing (Maitra et al., 2014; Mekuriaw et al., 2017; Sahoo et al., 2019; Sankhyan et al., 2019). Pada penelitian ini, target gen KiSS1 diperoleh dengan menentukan primer atau sekuen basa pengapit. Primer didesain dengan menggunakan Primer3 (*free online*) (Untergasser et al., 2012). Berdasarkan hasil penelitian diperoleh 3 target gen KiSS1 yaitu KiSS1.L1, KiSS1.L2

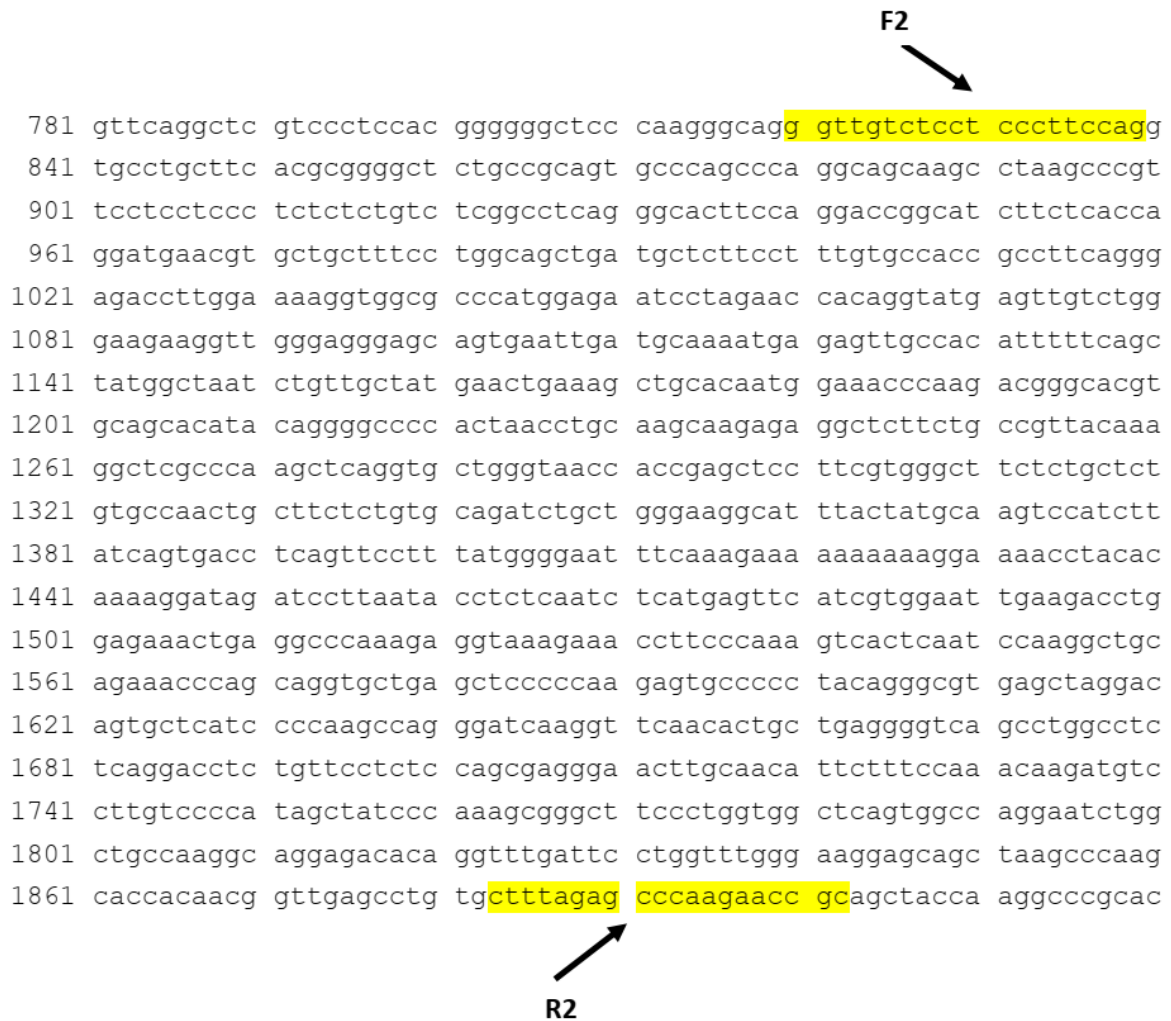
dan KiSS1.L3 (Gambar 1-3). Target KiSS1.L1 merupakan daerah 5'UTR dan ekson 1, KiSS1.L2 merupakan daerah 5'UTR, ekson 1 dan intron 1, dan KiSS1.L3 merupakan daerah intron 1 dan ekson 2.



Gambar 1. Target gen KiSS1.L1



Gambar 2. Target gen KiSS1.L3



Gambar 3. Target gen KiSS1.L2

Penentuan genotip kambing berdasarkan marker gen KiSS1 menggunakan banyak metode salah satunya adalah dengan menggunakan metode PCR-RFLP dimana enzim restriksi memiliki peran dalam mengenali sekuen DNA. Enzim restriksi bekerja secara spesifik pada sekuen yang dikenali sehingga dapat digunakan untuk membedakan sekuen DNA pada gen KiSS1 kambing. Berdasarkan hasil peninjauan 3 target gen KiSS1 ditemukan sembilan SNP. Tiga SNP terdeteksi pada 5'UTR, empat SNP di intron 1 dan dua SNP di ekson 2 (Tabel 2). Sembilan SNP yang ditemukan dalam penelitian ini digunakan untuk pemetaan enzim restriksi pada gen KiSS1 pada kambing.

Tabel 2. Identifikasi SNP pada gen KiSS1 kambing

Primer	Lokasi	SNP
KiSS1.L1	5'UTR	g.384G/A
	5'UTR	g.473G/A
	5'UTR	g.505A/T
KiSS1.L2	Intron 1	g.1417G/A
	Intron 1	g.1428G/A
	Intron 1	g.1608G/A
KiSS1.L3	Intron 1	g.3002G/A
	Ekson 2	g.3436T/C
	Ekson 2	g.3592C/A

Catatan: Referensi sekuen *GenBank Acc. No.* GU142847.1

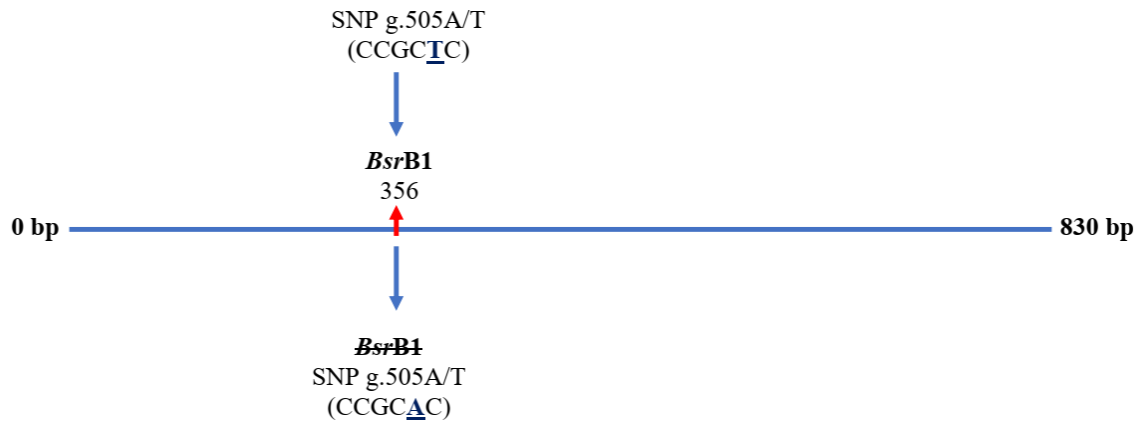
Pada penelitian ini ditemukan tiga SNP yang dikenali oleh enzim restriksi. Enzim *BsrB1* (CCG'CTC) mengenali basa pada SNP g.505A/T, enzim *FatI* (_CATG) dan *NlaIII* ('CATG) mengenali basa pada SNP g.1608G/A, dan enzim *AciI* (C'CG_C) dan *Bstul* (CG'CG) mengenali basa pada SNP g.3592C/A (Tabel 3). Berdasarkan jumlah potongan dan ukuran pita yang terbentuk, terdapat 3 enzim yang dapat direkomendasikan untuk *genotyping* kambing menggunakan metode PCR-RFLP yaitu enzim *BsrB1*, *FatI* dan *NlaIII*. Hal ini dikarenakan jumlah pita yang terbentuk tidak terlalu banyak, ukuran pita >100 bp dan ukuran pita tidak berdekatan, sehingga pada saat visualisasi hasil digesti DNA dapat terlihat dengan jelas.

Tabel 3. Pemetaan enzim restriksi pada gen KiSS1 kambing

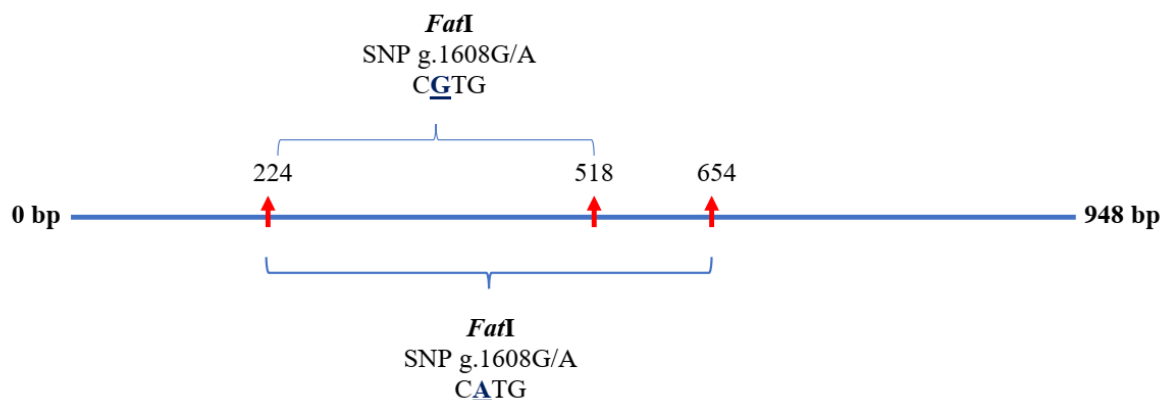
Enzim	SNP	Jumlah pita	Ukuran pita
<i>BsrB1</i> (CCG'CTC)	g.505A/T		
	Alel A	1	830
	Alel T	2	356, 474
<i>FatI</i> (_CATG')	g.1608G/A		
	Alel G	3	224, 294, 430
	Alel A	4	224, 294, 132, 294
<i>NlaIII</i> (CATG_)	g.1608G/A		
	Alel G	3	228, 294, 426
	Alel A	4	228, 294, 136, 290
<i>AciI</i> (C'CG_C)	g.3592C/A		
	Alel C	22	155, 52, 32, 2,7, 3, 15, 25, 24, 2, 38, 39, 17, 40, 7, 17, 2, 6, 6, 11, 2,77.
	Alel A	21	155, 52, 32, 2,7, 3, 15, 25, 24, 2, 38, 39, 17, 40, 7, 17, 2, 6, 6, 11, 79.
<i>Bstul</i> (CG'CG)	g.3592C/A	12	
	Alel C	11	209, 32, 7, 45, 24, 32, 128,8,2, 2, 12, 77.
	Alel A		209, 32, 7, 45, 24, 32, 128,8,2, 2, 89.

Ilustrasi pemotongan enzim *BsrB1*, *FatI* dan *NlaIII* terdapat pada Gambar 4-6. Pada penelitian sebelumnya dilakukan pemetaan enzim restriksi pada gen MC4R pada kambing Bligon. Pada penelitian tersebut terdapat SNP pada lokasi g.1079C/T yang dikenali oleh 5

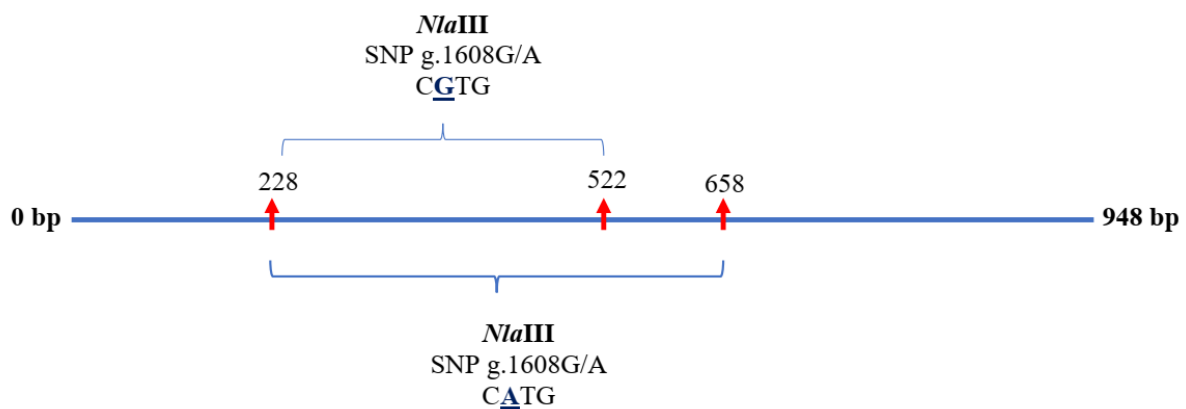
yaitu *RsaI*, *Acc651* dan *KpnI* (Latifah et al., 2017). Pada penelitian Latifah et al. (2018), enzim *KpnI* digunakan untuk *genotyping* kambing Bligon berdasarkan SNP g.1079C/T.



Gambar 4. Ilustrasi pemetaan enzim *BsrBI* yang mengenali SNP g.505A/T



Gambar 5. Ilustrasi pemetaan enzim *FatI* yang mengenali SNP g.1608G/A



Gambar 6. Ilustrasi pemetaan enzim *NlaIII* yang mengenali SNP g.1608A/T

KESIMPULAN

Enzim restriksi *Bsr*B1, *Fat*I dan *Nla*III dapat direkomendasikan untuk *genotyping* kambing menggunakan metode PCR-RFLP pada penelitian selanjutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Universitas Pendidikan Muhammadiyah Sorong yang telah memberikan dukungan dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Hall, T., I. Biosciences & C. Carlsbad. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* 2:60–61.
- Latifah, L., D. Maharani, A. Kustantinah & T. Hartatik. 2018. Association of melanocortin 4 receptor gene polymorphism with growth traits in Bligon goat. *J. Indones. Trop. Anim. Agric.* 43:343–351.
- Latifah, D.A. Priyadi, D. Maharani, Kustantinah & T. Hartatik. 2017. Genetic analysis using partial sequencing of melanocortin 4 receptor (MC4R) gene in Bligon goat. *Media Peternak*. 40:71–77. doi:10.5398/medpet.2017.40.2.71.
- Li, D., W. Yu & M. Liu. 2009. Regulation of KiSS1 gene expression. *Peptides* 30:130–138.
- Maitra, A., R. Sharma, S. Ahlawat, M.S. Tantia, M. Roy & V. Prakash. 2014. Association analysis of polymorphisms in caprine KiSS1 gene with reproductive traits. *Anim. Reprod. Sci.* 151:71–77.
- Mekuriaw, G., J.M. Mwacharo, T. Dessie, O. Mwai, A. Djikeng, S. Osama, G. Gebreyesus, A. Kidane, S. Abegaz & K. Tesfaye. 2017. Polymorphism analysis of kisspeptin (KISS1) gene and its association with litter size in Ethiopian indigenous goat populations. *African J. Biotechnol.* 16:1254–1264.
- Sahoo, S.S., C. Mishra, R. Kaushik, P.K. Rout, M.K. Singh, S. Bhusan & M.S. Dige. 2019. Association of a SNP in KISS 1 gene with reproductive traits in goats. *Biol. Rhythm Res.* 1–12.
- Sankhyan, V., Y.P. Thakur & P.K. Dogra. 2019. Association of kisspeptin gene (KISS1) with litter size in migratory Gaddi goats in western Himalayan state of Himachal Pradesh. *Indian J. Anim. Sci.* 89:1352–1355.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm & S.G. Rozen. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40:e115–e115.
- Williams, R.J. 2003. Restriction endonuclease. *Mol. Biotechnol.* 23:225–243.